

550, 277

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. September 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/082831 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **B01L 3/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002978

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. März 2004 (22.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 12 670.8 21. März 2003 (21.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRIZ BIOCHEM GMBH** [DE/DE];  
Staffelseestrasse 6, 81477, München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HARTWICH, Gerhard** [DE/DE]; Niebelungenstrasse 10, 80639 München

(DE). **HILLEBRANDT, Heiko** [DE/DE]; Hedwig-Dransfeld-Allee 30, 80637 München (DE).

(74) Anwalt: **SCHWARZENSTEINER, Marie-Luise**; Sebastianplatz 7, 80331 München (DE).

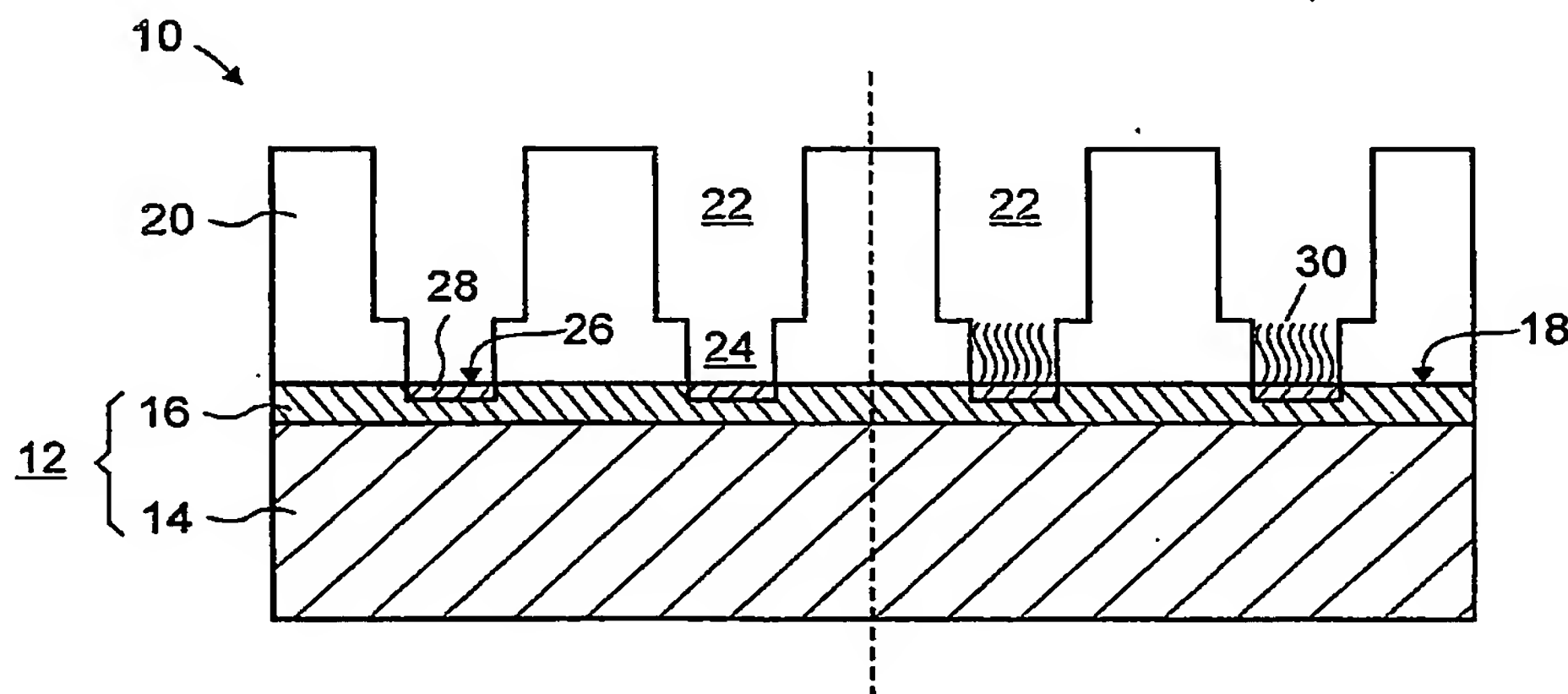
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SUBSTRATE FOR WETTING PRE-DETERMINED WETTING POINTS IN A CONTROLLED MANNER WITH SMALL VOLUMES OF LIQUID, SUBSTRATE COVER AND FLOW CHAMBER

(54) Bezeichnung: SUBSTRAT ZUR KONTROLLIERTEN BENETZUNG VORBESTIMMTER BENETZUNGSSTELLEN MIT KLEINEN FLÜSSIGKEITSVOLUMINA, SUBSTRATABDECKUNG UND FLUSSKAMMER



(57) Abstract: The invention relates to a substrate for wetting pre-determined wetting points in a controlled manner with small volumes of liquid. Said substrate comprises a carrier plate with a horizontal main surface for wetting pre-determined wetting points with a liquid, and a flat protective layer which is applied to the carrier plate and separates the main surface from the environment. Said protective layer comprises recesses extending vertically in relation to the main surface of the carrier plate, said recesses defining the pre-determined wetting points on the carrier points. The protective layer also contains at least one supply channel leading towards the vertical recesses, reducing the thickness of the flat protective layer and used to supply the wetting liquid to the pre-determined wetting points. In another form of embodiment, the protective layer contains at least one cavity, reducing the thickness of the flat protective layer and used to receive a supply volume of wetting liquids, and comprises vertical recesses which are arranged in the cavities and extend towards the main surface of the carrier plate, said recesses defining the wetting points on the carrier plate and receiving the wetting liquids of the respective cavities.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/082831 A1



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

---

**(57) Zusammenfassung:** Ein Substrat zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit kleinen Flüssigkeitsvolumina, umfasst eine Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche zur Benetzung mit einer Flüssigkeit an vorbestimmten Benetzungsstellen, und eine auf die Trägerplatte aufgebrachten flächigen Schutzschicht, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt, wobei die Schutzschicht sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstreckende vertikale Aussparungen aufweist, die die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Trägerplatte definieren, und einen oder mehrere zu den vertikalen Aussparungen führende Zuführungskanäle mit reduzierter Dicke der flächigen Schutzschicht enthält, zum Zuführen der Benetzungsflüssigkeit zu den vorbestimmten Benetzungsstellen. Nach einem weiteren Aspekt enthält die Schutzschicht eine oder mehrere Einsenkungen mit reduzierter Dicke der flächigen Schutzschicht zur Aufnahme eines Vorratsvolumens von Benetzungsflüssigkeiten und weist in den Einsenkungen angeordnete, sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstreckende vertikale Aussparungen auf, die die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Trägerplatte definieren, und die die Benetzungsflüssigkeiten der jeweiligen Einsenkungen aufnehmen.

**Substrat zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen  
mit kleinen Flüssigkeitsvolumina, Substratabdeckung und Flusskammer**

5

**Technisches Gebiet**

Die Erfindung betrifft ein Substrat zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit kleinen Flüssigkeitsvolumina. Die Erfindung betrifft ferner ein Herstellungsverfahren, eine Substratabdeckung für ein solches Substrat, sowie eine Flusskammer mit einem Substrat und einer Substratabdeckung.

15

**Stand der Technik**

Das kontrollierte Benetzen eines Substrates mit einer Flüssigkeit hat breite Anwendung in Industrie und Wissenschaft. Speziell im Bereich der Biowissenschaften, der Medizintechnik und der Sensorik wurde in den letzten Jahren das Herstellen von mikrostrukturierten Substraten für die Analytik vorangetrieben, um so genannte Lab-on-a-chip Produkte zu erhalten. Diese Produkte sollen es im sogenannten High-throughput-screening (HTS) ermöglichen, in paralleler Weise eine Vielzahl von möglichen Reaktionen in kurzer Zeit automatisiert zu untersuchen. Für diese Produkte ist es allerdings notwendig, kleine Flüssigkeitsmengen sowohl für eine Funktionalisierung der Oberflächen als auch zum Aufbringen der Testflüssigkeiten bei einer Analyse in gezielter Weise an ausgezeichneten Stellen des Substrates aufbringen zu können.

30

Im Bereich der Sensorik werden zwei verschiedene Ansätze für die Analytik von Flüssigkeiten eingesetzt:

Die Reaktion zweier Komponenten kann durch das Mischen zweier flüssiger, die Komponenten enthaltenden Phasen in einem Reaktionsgefäß untersucht werden. Durch diese Reaktion ändern sich Eigenschaften der Flüssigkeiten im Reaktionsgefäß in detektierbarer Weise. Die Analytik in der Volumenphase hat  
5 auf der einen Seite den Vorteil, dass speziell Proteine ihre spezifischen Funktionen beibehalten, wobei auf der anderen Seite die oft benötigten großen Volumina von Nachteil sind. Somit ist es nötig, Substrate zu schaffen, die extrem kleine Reaktionsgefäße zur Verfügung stellen.

10

Im einem anderen Ansatz benutzt man Oberflächen, die mit verschiedenen Kopplungsgruppen versehen sind und spezifisch bestimmte Analyten binden können, um unbekannte Flüssigkeiten auf das Vorhandensein dieser Analyten zu untersuchen. Hierzu muss die Sensoroberfläche zunächst mit den Kopp-  
15 lungsgruppen funktionalisiert, dann mit der unbekannten Flüssigkeit in Kontakt gebracht und anschließend das Anbinden des Analyten detektiert werden. Auch hier muss also wieder mit kleinen Volumina auf Substraten gearbeitet werden.

20 Für die Detektion solcher Bindungsereignisse an Oberflächen stehen im Stand der Technik eine Vielzahl von Verfahren wie Fluoreszenzspektroskopie, Radiometrie, Elektrochemie und eine Vielzahl oberflächen-sensitive Methoden wie AFM, SPR oder Schwingquarze zur Verfügung.

25 Speziell im Bereich der DNA-Analytik oder der Proteom-Forschung bestehen die unbekannten Analyt-Flüssigkeiten meistens aus einer großen Anzahl verschiedener Substanzen in extrem kleinen Mengen, so dass ein potentieller Sensor zur Analyse dieser Flüssigkeiten mit Hinblick auf die für industrielle Anwendungen wichtigen Faktoren wie Kosten oder Zeit einen hohen Grad an  
30 Parallelisierung aufweisen, mit sehr kleinen Materialmengen auskommen und sehr sensitiv sein muss. Die Parallelisierung einer solchen Analyse kann entweder durch eine laterale Strukturierung der Sensoroberfläche in Bereiche

verschiedener Funktionalitäten bzw. im Falle eines Volumenansatzes durch eine große Anzahl an Reaktionsgefäßen erreicht werden.

Für die Parallelisierung von Analysen in der Volumenphase stehen kommerziell erhältliche Mikrotiter-Platten zur Verfügung, die mit Volumina von nur etwa 10 µl pro Reaktionsgefäß betrieben werden können. Um aber das parallele Befüllen der Platten mit solch kleinen Volumina in kurzer Zeit zu erreichen sind meist teure Pipetier-Roboter nötig.

- 10 Für die Analyse einer unbekannten Flüssigkeit mit Hilfe der oben beschriebenen Sensoroberflächen mit lateral begrenzten Bereichen unterschiedlicher Funktionalitäten stehen im Weiteren zwei Möglichkeiten zur Verfügung: das Benetzen des gesamten Substrates oder aber das gezielte Benetzen nur der funktionalisierten Bereiche des Substrates mit der Analyt-Flüssigkeit. Beide
- 15 gerade erwähnten Varianten der Analyse einer unbekannten Flüssigkeiten mit einer Sensoroberfläche weisen jedoch entscheidende Nachteile auf. Das Benetzen der gesamten Sensoroberfläche führt zu einem großen Totvolumen, so dass dieses Verfahren sehr große Flüssigkeitsmengen benötigt. Durch die gezielte Benetzung nur der funktionalisierten Bereiche der Substratoberfläche
- 20 wird zwar die zu verwendende Flüssigkeitsmenge drastisch reduziert, auf der anderen Seite werden aber spezielle Geräte nötig, die dieses gezielte Aufbringen kleiner Volumina ermöglichen.

- Aus dem Stand der Technik sind für das gezielte Aufbringen kleiner Volumina
- 25 kommerziell erhältliche Spotter (z.B. der Firma Cartesian Technologies) bekannt, die aber mit erheblichen Anschaffungskosten verbunden sind und geschultes Personal erfordern. Ein weiteres Verfahren zur partiellen Benetzung eines Substrates mit einer Flüssigkeit ist das Mikrokontakt-Drucken µCP (micro-contact-printing), das erstmals von Whitesides 1994 (A. Kumar, G.M. Whitesides, Science, 1994, 263, 60; US-A-6 048 623) vorgestellt wurde. Bei die-
- 30 sem Verfahren wird ein mikrostrukturierter Stempel mit einer Flüssigkeit benetzt, anschließend in direktem Kontakt mit dem zu bearbeitenden Substrat



gebracht und so der Oberfläche eine laterale chemische Struktur aufgeprägt. Eine große Schwierigkeit dieser Technik ist die Realisierung eines gleichförmigen Kontakts zwischen Stempel und Substrat, der für das Gelingen bzw. die Qualität von entscheidender Bedeutung ist.

5

Somit sind alle bekannten Verfahren für breite Anwendungen, beispielsweise zur standardisierten Analytik in einer Arztpraxis, nur bedingt geeignet.

10

### **Darstellung der Erfindung**

15

Hier setzt die Erfindung an. Der Erfindung, wie sie in den Ansprüchen gekennzeichnet ist, liegt die Aufgabe zugrunde, ein Substrat und ein Verfahren zu seiner Herstellung anzugeben, das die kontrollierte Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit kleinen Flüssigkeitsvolumina insbesondere zu Analysezwecken ermöglicht und die eingangs genannten Nachteile des Stands der Technik vermeidet.

20

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Substrat nach Anspruch 1 oder Anspruch 28, die Substratabdeckung nach Anspruch 45, die Flusskammer nach Anspruch 47 und das Herstellungsverfahren nach Anspruch 50 oder Anspruch 51 gelöst. Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

25

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

#### **Allgemeines**

μCP

Micro-Contact-Printing.

AFM

Atomic-Force-Microscope.

Analytflüssigkeit	Flüssigkeit, die potentiell einen Analyten enthält, der über einen Sensor nachgewiesen werden soll.
Flüssigkeit	nicht nur reine flüssige Stoffe, sondern auch Flüssigkeiten mit Detergenz, jede Art von gelösten organischen oder anorganischen Stoffen, sowie Emulsionen, Suspensionen und kolloidalen Lösungen.
Funktionalisierung	Aufbringen von Ligat-Molekülen auf die Benetzungsstellen eines Substrats. Diese Moleküle können hierbei auf dem Substrat physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ bzw. über Komplexbildung gebunden sein.
HTS	High-throughput-screening
Laser-Ablation	partiell oder vollständiges Entfernen von organischen oder anorganischen Schutzschichten, aber auch das Entfernen von Verunreinigungen auf einer Trägerplatte durch Einstrahlung von Laserlicht.
Lötstopplack	aus der Leiterplattentechnologie bekannter Lack, der auf Platinen aufgebracht wird, um beim automatisierten Löten das Entstehen von Lötzinnbrücken zu verhindern.
Pseudo-Kontakt-Drucken	Aufbringen einer Flüssigkeit mit Hilfe einer Nadel, Kapillare, Pinzette, eines Ringes oder Stempels bzw. einer Anordnung von Nadeln, Kapillaren, Pinzetten, Ringen oder Stempeln auf ein strukturiertes Substrat, wobei hier wegen der vorhandenen Schutzschicht und der lateralen Ausdehnung der Spitzen der Benetzungsvorrichtung, die bevorzugt größer als die freien zu benetzenden Flächen ist kein direkter Kontakt zwischen der Vorrichtung und dem Substrat zustande kommt.
Schutzschicht	auf die Trägerplatte vor der eigentlichen Benetzung aufgebrachte Schicht. Hierfür ist jedes beliebige Material verwendbar, das an einer Oberfläche eine geschlossene Schicht bildet und somit die Substratoberfläche von der Umgebung trennt und zu einem spä-

teren Zeitpunkt durch Laser-Ablation partiell und rückstandsfrei entfernt werden kann. Diese Schutzschicht kann aus organischen als auch anorganischen Materialien bestehen, je nach Substrattyp und Anwendungsvoraussetzungen physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ bzw. über Komplexbildung gebunden sein und mit beliebigen Techniken aufgebracht werden.

SEM

Scanning electron microscopy

Trägerplatte

Festkörper mit einer frei zugänglichen horizontalen Hauptfläche, der somit mit einer Flüssigkeit benetzt werden kann. Als Festkörperträgerplatten kommen sowohl Kunststoffe, als auch Metalle, Halbleiter, Gläser, Verbundstoffe oder poröse Materialien in Frage.

UV

Ultraviolettes Licht

### Genetik

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PNA	Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N(COCH <sub>2</sub> -Base)-CH <sub>2</sub> CO- Einheit hybridisiert PNA mit DNA).
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
Base	A, G, T, oder C
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenig-



- 7 -

	tens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.
Nukleinsäure-Oligomer	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA, PNA oder RNA Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
ss	single strand (Einzelstrang)

### **Chemikalien**

Fluorophor	chemische Verbindung (chemische Substanz), die in der Lage ist, bei Anregung mit Licht ein längerwelliges (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht abzugeben. Fluorophore (Fluoreszenzfarbstoffe) können Licht in einem Wellenlängenbereich vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich absorbieren. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind typischerweise um 15 bis 40 nm gegeneinander verschoben (Stokes-Shift).
------------	--

Fluorescein	Resorcinphtalein
Ligand	Bezeichnung für Moleküle, die vom Ligaten spezifisch gebunden werden; Beispiele von Liganden im Sinne der vorliegenden Schrift sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Ligand eines Antigens), Antigene (als Ligand eines Antikörpers), Rezeptoren (als Ligand eines Hormons), Hormone (als Ligand eines Rezeptors) oder Nukleinsäure-Oligomere (als Ligand des komplementären Nukleinsäure-Oligomers).
Ligat	Bezeichnung für (Makro-) Molekül, an dem sich spezifische Erkennungs- und Bindungsstellen für die Ausbildung eines Komplexes mit einem Liganden befinden (Template).
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Spacer	Beliebige molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, in der Regel Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl-, Heteroalkynyl-Ketten. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.
Au-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -ss-Oligo-Fluorescein	Gold-Oberfläche mit kovalent aufgebrachtener Monolayer aus derivatisiertem Einzelstrang-Oligonukleotid. Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S) <sub>2</sub> zum P-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Am freien Ende trägt das Sonden-Oligonukleotid einen kovalent angebundenen Fluorophor Fluorescein.
Oligo-Spacer-S-S-Spacer-Oligo	zwei gleiche oder verschiedene Nukleinsäure-Oligomere, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, wobei die

Disulfidbrücke über zwei beliebige Spacer an die Nukleinsäure-Oligomere angebunden ist und die beiden Spacer eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidbrücke und dem jeweiligen Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14 und diese Spacer wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diese durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein können.

(n x HS-Spacer)-  
oligo

Nukleinsäure-Oligomer, an das n Thiofunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei die Spacer jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Thiofunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein und "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

(n x R-S-S-  
Spacer)-oligo

Nukleinsäure-Oligomer, an das n Disulfidfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei ein beliebiger Rest R die Disulfidfunktion absättigt. Der Spacer zur Anbindung der Disulfidfunktion an das Nukleinsäure-Oligomer kann jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Der Platzhalter "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

In einem ersten Aspekt umfasst ein gattungsgemäßes Substrat erfindungsgemäß eine Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche zur Benetzung mit einer Flüssigkeit an vorbestimmten Benetzungsstellen, und eine auf die Trägerplatte aufgebrachte flächige Schutzschicht, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt. Die Schutzschicht weist sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstreckende vertikale Aussparungen auf, die die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Trägerplatte definieren, und enthält einen oder mehrere zu den vertikalen Aussparungen führende Zuführungskanäle mit reduzierter Dicke der flächigen Schutzschicht, zum Zuführen der Benetzungsflüssigkeit zu den vorbestimmten Benetzungsstellen.

Dabei fallen im Sinne der vorliegenden Erfindung unter den Begriff Flüssigkeit nicht nur reine flüssige Stoffe, sondern auch Flüssigkeiten mit Detergenz, jede Art von gelösten organischen oder anorganischen Stoffen, sowie Emulsionen, Suspensionen und kolloidalen Lösungen.

Durch die Struktur aus Zuführungskanälen, die zu den Benetzungsstellen führen, wird die für eine Analyse benötigte Analytflüssigkeit im Vergleich zur Benetzung des gesamten Substrates deutlich verringert.

Nach einer bevorzugten Ausgestaltung sind die vertikalen Aussparungen in dem Zuführungskanal oder den Zuführungskanälen angeordnet. Insbesondere kann jede vertikale Aussparung in genau einem Zuführungskanal liegen und kann somit über diesen mit der Benetzungsflüssigkeit versorgt werden. Nach einer anderen bevorzugten Variante liegt jede vertikale Aussparung im Schnittpunkt von mehreren Zuführungskanälen. Während erfindungsgemäß bevorzugt ist, dass jede vertikale Aussparung im Schnittpunkt von genau zwei Zuführungskanälen liegt, sind auch solche Varianten Teil der Erfindung, bei denen jede vertikale Aussparung im Schnittpunkt von beispielsweise drei oder vier Zuführungskanälen liegt.

In diesem Zusammenhang kann mit Vorteil auch vorgesehen sein, dass in einem Schnittpunkt von zwei oder mehreren Zuführungskanälen jeweils eine Gruppe von mehreren vertikalen Aussparungen liegt. Eine solche Gruppe kann je nach beabsichtiger Anwendung beispielsweise vier oder sechzehn einzelne  
5 Aussparungen umfassen und dient insbesondere der Verbesserung der Messstatistik.

Die vertikalen Aussparungen oder Aussparungsgruppen sind mit Vorteil in Form einer  $n \times m$  Matrix mit  $n$  Zeilen und  $m$  Spalten angeordnet, wobei  $n$  und  
10  $m$  größer oder gleich 2 sind, und wobei bevorzugt  $n$  und  $m$  jeweils unabhängig voneinander zwischen 10 und 1000 liegen. Bevorzugt ist dabei, dass die Anzahl  $n$  der Zeilen und die Anzahl  $m$  der Spalten gleich ist, und/oder dass die lateralen Abstände benachbarter Aussparungen oder Aussparungsgruppen in den Zeilen und Spalten gleich sind.

15

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung sind die  $m$  Aussparungen oder Aussparungsgruppen einer Zeile jeweils in einem von  $n$  parallelen Zeilen-Zuführungskanälen angeordnet. Auch die  $n$  Aussparungen oder Aussparungsgruppen einer Spalte können mit Vorteil jeweils in einem von  $m$  parallelen  
20 Spalten-Zuführungskanälen angeordnet sein, so dass jede Aussparung oder Aussparungsgruppen im Schnittpunkt eines Zeilen- und eines Spalten-Zuführungskanals liegt. Vorteilhaft weisen die Zeilen-Zuführungskanäle und die Spalten-Zuführungskanäle gleiche Querschnittsform auf.

25 In einer anderen besonders bevorzugten Ausgestaltung ist jeweils eine  $n' \times m'$  Teilmatrix von Aussparungen oder Aussparungsgruppen in einem mäanderförmigen Zuleitungskanal angeordnet, wobei  $n = k_n \cdot n'$  und  $m = k_m \cdot m'$  ist, mit ganzen Zahlen  $k_n$  und  $k_m$  größer oder gleich 1. Beispielsweise können  $k_n$  und  $k_m$  beide gleich 1 sein, so dass  $n' = n$  und  $m' = m$  ist, also alle Benetzungsstellen der  $n \times m$  Aussparungsmatrix in einem einzigen mäanderförmigen Zuführungskanal angeordnet sind und von diesem mit der Benetzungsflüssigkeit  
30 versorgt werden. Ist nach einem anderen Beispiel  $k_n = n/2$  und  $k_m = 1$  gewählt,



- 12 -

so dass  $n' = 2$  und  $m' = m$  ist, so sind jeweils zwei Zeilenkanäle zu einem U-förmigen Kanal zusammengefasst. In diesem Fall können der Einlass und Auslass der Kanäle auf derselben Seite des Substrats liegen.

- 5 Die Dicke der Schutzschicht in den Zuführungskanälen ist gegenüber der Dicke der Schutzschicht außerhalb der Aussparungen und Zuführungskanäle zweckmäßig um 10% bis 99%, bevorzugt um 20% bis 95%, besonders bevorzugt um 50% bis 95% reduziert.
- 10 Dabei weist die Schutzschicht in einer vorteilhaften Ausgestaltung außerhalb der Aussparungen und Zuführungskanäle eine Dicke  $d_s$  zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$  auf. In den Zuführungskanälen weist die Schutzschicht eine reduzierte Dicke  $d_k$  zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen etwa 10  $\mu\text{m}$  und etwa 50  $\mu\text{m}$  auf.
- 15 Die Zuführungskanäle verlaufen bevorzugt im Wesentlichen parallel zur Hauptfläche der Trägerplatte. Sie können allerdings auch eine leichte Steigung oder ein leichtes Gefälle aufweisen. Der Querschnitt der Zuführungskanäle ist mit Vorteil rechteckig oder trapezförmig. Dies ermöglicht eine unproblematische Herstellung und sichert einen guten Verschluss der Kanäle bei
- 20 Verwendung der weiter unten beschriebenen Substratabdeckung.
- Die Zuführungskanäle weisen mit Vorteil eine charakteristische Breite  $b_k$  zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 250  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von etwa 10  $\mu\text{m}$  bis etwa 150  $\mu\text{m}$  auf.
- 25 Dabei ist die charakteristische Breite  $b_k$  bei rechteckigem Querschnitt einfach durch die konstante Breite der Kanäle gegeben. Bei Zuführungskanälen mit trapezförmigen Querschnitt ist die charakteristische Breite  $b_k$  durch das arithmetische Mittel der Breite des Kanals am Boden und an der oberen Kanalbegrenzung gegeben. Analog ergibt sich eine charakteristische Breite  $b_k$  für andere Querschnittsformen durch die Bedingung, dass das Produkt aus der charakteristischen Breite und der Kanaltiefe gleich der Querschnittsfläche ist.
- 30

Die Benetzungsstellen weisen nach der Erfindung bevorzugt eine charakteristische Ausdehnung von etwa 5  $\mu\text{m}$  bis etwa 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von etwa 10  $\mu\text{m}$  bis etwa 100  $\mu\text{m}$  auf.

- 5 Nach einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Substrats weisen die vertikalen Aussparungen einen im Wesentlichen rechteckigen, elliptischen oder kreisförmigen Querschnitt auf. In letzterem Fall ist die angesprochene charakteristische Ausdehnung durch den Kreisradius gegeben, in den anderen Fällen durch das arithmetische Mittel der Seitenlängen bzw. der  
10 großen und kleinen Ellipsenachse gegeben.

Zur Ausbildung von Flusskammern kann das Substrat mit einer Deckplatte bedeckt sein, die die Zuführungskanäle nach oben verschließt.

- 15 In einem zweiten Aspekt umfasst die Erfindung ein gattungsgemäßes Substrat mit einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche zur Benetzung mit einer Flüssigkeit an vorbestimmten Benetzungsstellen, und einer auf die Trägerplatte aufgetragenen flächigen Schutzschicht, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt, wobei die Schutzschicht eine oder mehrere Einsenkungen  
20 mit reduzierter Dicke der flächigen Schutzschicht zur Aufnahme eines Vorratsvolumens von Benetzungsflüssigkeiten enthält, und in den Einsenkungen angeordnete, sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstreckende vertikale Aussparungen aufweist, die die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Trägerplatte definieren, und die die Benetzungsflüssigkeit aus der jeweiligen Einsen-  
25 kung aufnehmen. Diese Ausführungsform der Erfindung stellt eine einfache Variante dar, um Gruppen von Benetzungsstellen mit jeweils einer Art von Flüssigkeit zu benetzen.

- Die vertikalen Aussparungen sind vorzugsweise jeweils in Form einer  $n \times m$   
30 Matrix mit  $n$  Zeilen und  $m$  Spalten in den Einsenkungen angeordnet, wobei  $n$  und  $m$  größer oder gleich 2 sind, und wobei bevorzugt  $n$  und  $m$  jeweils zwischen 4 und 20 liegen. Bevorzugt ist dabei, wenn die Anzahl  $n$  der Zeilen und

die Anzahl  $m$  der Spalten gleich ist, und/oder wenn die lateralen Abstände benachbarter Aussparungen in den Zeilen und Spalten gleich sind.

Wie beim ersten Aspekt der Erfindung ist die Dicke der Schutzschicht in den  
5 Einsenkungen gegenüber der Dicke der Schutzschicht außerhalb der Aussparungen und den Einsenkungen um 10% bis 99%, bevorzugt um 20% bis 95%, besonders bevorzugt um 50% bis 95% reduziert. Die Schutzschicht weist außerhalb der Aussparungen und den Einsenkungen mit Vorteil eine Dicke  $d_s$  zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$  auf. In  
10 den Einsenkungen weist die Schutzschicht eine reduzierte Dicke  $d_k$  auf, die vorteilhaft zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen etwa 10  $\mu\text{m}$  und etwa 50  $\mu\text{m}$  liegt.

Die Einsenkungen können beispielsweise einen rechteckigen oder trapezförmigen Querschnitt aufweisen. Ihre charakteristische Abmessung liegt typischerweise zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 2000  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen etwa 300  $\mu\text{m}$  und etwa 1000  $\mu\text{m}$ . Die charakteristische Abmessung ist beispielsweise bei  
15 kreisförmigem Querschnitt durch den Kreisradius oder bei rechteckigem Querschnitt durch das arithmetische Mittel der Seitenlängen gegeben.

20 Die in den Einsenkungen angeordneten Benetzungsstellen weisen mit Vorteil eine charakteristische Ausdehnung von etwa 5  $\mu\text{m}$  bis etwa 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von etwa 10  $\mu\text{m}$  bis etwa 100  $\mu\text{m}$  auf, und sie haben, wie beim ersten Aspekt, vorzugsweise einen im Wesentlichen rechteckigen, elliptischen oder  
25 kreisförmigen Querschnitt.

In beiden Aspekten besteht die auf die Trägerplatte aufgebrachte Schutzschicht zweckmäßig aus einem Material, das an die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ  
30 bzw. über Komplexbildung bindet. Sie kann insbesondere durch einen positiven oder negativen Photolack, einen Lötstopplack, ein organisches Polymer, insbesondere Cellulose, Dextran oder Collagen gebildet sein. Die Schutz-

schicht wird vor der Benetzung mit einer beliebigen, dem Schutzschichtmaterial angepassten Technik aufgebracht.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung weist die Trägerplatte einen Grundkörper aus Kunststoff, Metall, Halbleiter, Glas, Verbundstoff, einem porösem Material oder einer Kombination dieser Materialien auf. Im Falle eines nichtleitfähigen Grundkörpers ist die Trägerplatte bevorzugt mit einer leitfähigen Schicht, beispielsweise aus Silizium, Platin oder Gold versehen, welche dann die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte bildet.

In einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung sind bei beiden Aspekten die vorbestimmten Benetzungsstellen mit spezifischen Sondenmolekülen funktionalisiert. Insbesondere sind dabei Sondenmoleküle an den vorbestimmten Benetzungsstellen an die Hauptfläche der Trägerplatte physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ oder über Komplexbildung gebunden.

Die vorbestimmten Benetzungsstellen sind in einer besonders bevorzugten Ausgestaltung mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert, die mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen bzw. Markern modifiziert sind. Insbesondere können die Nukleinsäure-Oligomere zur Visualisierung mit einem Fluorophor modifiziert sein.

In einer vorteilhaften Variante ist die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte durch eine Goldschicht gebildet und die vorbestimmten Benetzungsstellen sind mit Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierten Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert.

Die Erfindung umfasst auch eine Substratabdeckung für ein Substrat nach dem ersten Aspekt der Erfindung mit einer Abdeckungsträgerplatte mit einer Mehrzahl vorspringender Barriereelemente, deren Form und Größe auf die Form und Größe der Zuführungskanäle des Substrats abgestimmt sind, um die Zuführungskanäle in Teilbereichen zu verschließen.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung sind die Barriereelemente auf der Abdeckungsträgerplatte so angeordnet, dass sie nach dem Verbinden der Substratabdeckung mit dem Substrat nur eine oder eine bestimmte Anzahl an Kanalrichtungen offen lassen. Die Benetzungsstellen der unverschlossenen Kanäle können dann gezielt mit verschiedenen spezifischen Sondenmolekülen funktionalisiert bzw. mit einer Analytflüssigkeit versorgt werden. Durch die verschlossenen Zeilen-Zuführungskanäle bzw. Spalten-Zuführungskanäle wird eine Beeinflussung benachbarter Kanäle ausgeschlossen.

10

Die Barriereelemente können beispielsweise durch Laser-Ablation aus einer vollflächigen Lackschicht auf der Abdeckungsträgerplatte erzeugt werden. Je nach Anwendung ist es möglich, diese Substratabdeckung permanent mit dem Substrat zu verkleben, oder aber die Abdeckung mobil zu montieren, um später weitere Benetzungsschritte mit anderen oder derselben Abdeckung in anderen Stellungen zu ermöglichen.

15

Die Erfindung umfasst ferner eine Flusskammer mit einem Substrat nach dem ersten Aspekt der Erfindung und einer beschriebenen Substratabdeckung. Die Substratabdeckung kann dabei mit dem Substrat permanent oder lösbar verbunden sein.

20

Gemäß einer bevorzugten Weiterentwicklung weist die Anordnung der Aussparungen und der Zuführungskanäle des Substrats eine mehrzählige Symmetrie auf. Die Barriereelemente der Substratabdeckung sind dabei so auf der Abdeckungsträgerplatte angeordnet, dass die Substratabdeckung in verschiedenen Orientierungen auf dem Substrat platzierbar ist und dabei jeweils verschiedene Teile der Zuführungskanäle verschließt. Mit einer einzigen Substratabdeckung können so verschiedene Benetzungsmuster auf dem Substrat erzeugt werden.

25

30



Insbesondere kann die Flusskammer ein Substrat mit einer  $n \times n$  Aussparungsmatrix umfassen, bei dem jede Aussparung im Schnittpunkt zweier Zuführungskanäle liegt und die Zeilen- und Spalten-Zuführungskanäle gleiche Querschnittsform aufweisen. Die Barriereelemente der Substratabdeckung  
5 verschließen dann in einer ersten Orientierung die Zeilen-Zuführungskanäle und in einer zweiten, um  $90^\circ$  gegen die erste Orientierung gedrehten Orientierung die Spalten-Zuführungskanäle.

Ein Verfahren zum Herstellen eines Substrats nach dem ersten Aspekt der  
10 Erfindung umfasst die Verfahrensschritte:

- a) Bereitstellen einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche,
- b) Aufbringen einer flächigen Schutzschicht auf die Trägerplatte, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt,
- c) Strukturieren der Schutzschicht zur Erzeugung eines oder mehrerer Zuführungskanäle mit reduzierter Schutzschichtdicke, und  
15
- d) Erzeugen vertikaler Aussparungen in dem Zuführungskanal oder den Zuführungskanälen, welche sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstrecken und die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Hauptfläche der Trägerplatte definieren.

20

Ebenfalls Teil der Erfindung ist ein Verfahren zum Herstellen eines Substrats nach dem zweiten Aspekt der Erfindung, welches die Verfahrensschritte

- a) Bereitstellen einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche,
- b) Aufbringen einer flächigen Schutzschicht auf die Trägerplatte, die die  
25 Hauptfläche von der Umgebung trennt,
- c) Strukturieren der Schutzschicht zur Erzeugung einer oder mehrerer Einsenkungen mit reduzierter Schutzschichtdicke, und
- d) Erzeugen vertikaler Aussparungen in den Einsenkungen, welche sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstrecken und die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Hauptfläche der Trägerplatte definieren,  
30 umfasst.

In einer vorteilhaften Verfahrensvariante wird mit einem Vorhanggießverfahren ein Lötstopplack als Schutzschicht aufgebracht.

Die Aussparungen und/oder die Zuführungskanäle bzw. die Einsenkungen werden vorzugsweise mittels Laserablation, insbesondere durch Bestrahlung von Teilbereichen der Schutzschicht mit kontinuierlicher oder gepulster Laserstrahlung einer vorbestimmten Wellenlänge, bevorzugt im ultravioletten Spektralbereich erzeugt. Die Laserstrahlung kann direkt oder über eine Optik bzw. eine Maske auf die abzutragende Schutzschicht gerichtet werden.

10

Dabei wird beim Erzeugen der Aussparungen in Schritt d) zweckmäßig eine Oberflächenregion der Trägerplatte im Bereich der Benetzungsstellen aufgeschmolzen. Durch das Aufschmelzen der Oberfläche ergibt sich eine reduzierte Oberflächenrauigkeit und eine verbesserten Homogenität der Oberfläche der Trägerplatte.

15

Nach einer bevorzugten Weiterbildung werden die vorbestimmten Benetzungsstellen dann in einem Schritt e) mit spezifischen Sondenmolekülen funktionalisiert. Insbesondere können die vorbestimmten Benetzungsstellen in Schritt e) mit einem Spotting-Verfahren mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert werden.

20

Alternativ können die vorbestimmten Benetzungsstellen bei einem Substrat nach dem ersten Aspekt der Erfindung in Schritt e) durch Einspülen einer Lösung mit Nukleinsäure-Oligomeren in die Zuführungskanäle funktionalisiert werden. Bei einem Substrat nach dem zweiten Aspekt der Erfindung können die vorbestimmten Benetzungsstellen durch Befüllen der Einsenkungen mit einer Lösung mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert werden.

25

Weitere Ausgestaltungen und Vorteile der Erfindung werden nachfolgend im Detail beschrieben:

30

### **Aufbringen einer Schutzschicht auf das Substrat**

Erfindungsgemäß sind die Substrate nach dem ersten oder zweiten Aspekt mit einer Schutzschicht versehen. Diese Schutzschicht kann den kritischen Zeitraum zwischen der Herstellung der Trägerplatte und der Benetzung ihrer Oberfläche überbrücken, da die Schutzschicht das Adsorbieren von Verunreinigungen verhindert.

Für die Schutzschicht kann jedes beliebige Material verwendet werden, das an einer Oberfläche eine geschlossene Schicht bildet und somit die Substratoberfläche von der Umgebung trennt und zu einem späterem Zeitpunkt etwa durch Laser-Ablation an gewünschten Stellen entweder in seiner gesamten Dicke rückstandsfrei entfernt oder aber auf Bruchteile der ursprünglichen Dicke reduziert werden kann. Es versteht sich, dass mit Vorteil für eine gegebene Trägerplatte eine angepasste Schutzschicht gewählt wird, die in Bezug auf die Haftung zwischen Trägerplatte und Schutzschicht optimiert ist. Ebenso lässt sich die Schutzschicht im Hinblick auf die zu verwendende Flüssigkeit optimieren. Im Falle von wässrigen Lösungen bietet sich ein hydrophiles Schichtmaterial an, so dass die Flüssigkeiten die Zuleitungskanäle der Erfindung benetzen und Luftblasen vermieden werden. Bei öligen Flüssigkeiten ist hingegen hydrophobes Material zu bevorzugen.

Durch die Zugabe von Detergenzien zu den verwendeten Flüssigkeiten lassen sich unabhängig vom Schichtmaterial verbesserte Benetzungen der Kanalstrukturen und damit gute Flusseigenschaften erreichen. Neben üblichen bekannten Lacken aus der Lithographie (positive und negative Photolacke) und der Leiterplatten-Technologie (Lötstopplacke) eignen sich auch organische Polymere wie Cellulose, Dextran oder Collagen. Auch ist es denkbar, Lacke zu verwenden, deren spezielle Bestandteile beim Trocknen des Materials an der Oberfläche vorteilhafte Funktionalisierungen für besondere Anwendungen ausbilden.

Die Schutzschicht kann beispielsweise durch Sprühen im Falle der Photolacke, durch Spincoating oder Physisorption im Falle der organischen Polymere oder durch Siebdruck bzw. Vorhanggießen im Falle der Lötstopplacke auf die Trägerplatte aufgebracht werden. Bei den bevorzugten, aus der Leiterplattentechnologie bekannten Lötstopplacken, eignen sich sowohl 2-Komponenten als auch 1-Komponenten Lötstopplacke, die über Vorhanggießverfahren, Siebdruck oder Sprayverfahren aufgebracht werden und anschließend an der Luft oder durch UV-Bestrahlung aushärten können. Ein Vorteil dieser Verfahrensvariante besteht darin, dass die Dicke der Lötstopplackeschicht z.B. im Vorhanggießverfahren durch die Geschwindigkeit der Trägerplatte unter dem Lackvorhang in einem großen Bereich frei wählbar eingestellt werden kann.

#### **Laser-Ablation der Schutzschicht in beliebiger Geometrie**

Unter dem Begriff "Laser-Ablation" versteht man nicht nur das partielle oder vollständige Entfernen von organischen oder anorganischen Schutzschichten, sondern auch das Entfernen von Verunreinigungen auf einer Trägerplatte durch Einstrahlung von Laserlicht. Im Rahmen der Erfindung wird die Laser-Ablation mit Vorteil zur Entfernung oder Strukturierung der aufgetragenen Schutzschicht an gewünschten Stellen des Substrates in beliebiger Geometrie eingesetzt. Somit ist es möglich, verschiedene, genau definierte freie Substratflächen oder Bereiche mit verjüngter Schutzschicht in unterschiedlicher Größe auf ein und demselben Substrat-Design nur durch Veränderung der Laser-Belichtung zu realisieren.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist das Aufschmelzen der Trägerplattenoberfläche bei vollständigem Entfernen der Schutzschicht mittels Laser-Ablation, das durch Einstellung der Laserintensität oder der Bestrahlungsdauer auf die Gegebenheiten der Trägerplatte und der Schutzschicht erreicht werden kann. Dieses kurzfristige, oberflächennahe Aufschmelzen der Trägerplattenoberfläche schließt neben der Reduktion der Oberflächenrauigkeit auch vorhandene

Poren im Material und verbessert somit die Homogenität der freien Trägerplattenoberfläche. Außerdem werden durch die Ablation weniger Goldlagen von der Oberfläche Verunreinigungen entfernt.

- 5 Die Laser-Ablation kann durch direkte Einstrahlung des Lichts oder aber durch Einstrahlung des Lichts über eine Optik bzw. eine Maske erfolgen. Die Größe oder die Form der einzelnen freizulegenden oder strukturierten Benetzungsstellen und ihr lateraler Abstand sind hierbei beliebig und nur von der jeweiligen Anwendung abhängig. Die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts, so-
- 10 wie Einstrahldauer bzw. Anzahl und Dauer der Pulse hängen von der Kombination aus Schutzschicht und des Materials der Trägerplattenoberfläche ab und werden vorzugsweise für jedes Paar optimiert.

In einer bevorzugten Variante der Erfindung werden mit einem Excimer-Laser

15 über mehrere Masken in mehreren Prozessschritten Strukturen aus Kanälen bzw. Einsenkungen und sich zur Trägerplatte erstreckende Aussparungen in einen Lötstopplack geschrieben, welche das gezielte Benetzen der freien oder funktionalisierten Benetzungsstellen mit einer oder mehreren verschiedenen die Analyten enthaltenden Flüssigkeiten ermöglichen.

20

Beispielsweise werden in Lötstopplackschichten von typischerweise 100 – 150 µm Dicke mit einer bestimmten Anzahl an Laser-Pulsen verschiedene Kanäle der Tiefe 80 – 100 µm und der Breite 10 – 150 µm geschnitten und dann innerhalb der Kanäle das Substrat an ein oder mehreren Stellen mit Durchmes-

25 sern von etwa  $d = 10 - 100 \mu\text{m}$  durch weitere Laser-Pulse freigelegt, um die Benetzungsstellen zu definieren. Hierbei sind die lateralen Ausdehnungen der freigelegten Benetzungsstellen kleiner oder gleich der Breite der Zuleitungskanäle.

30

**Funktionalisierung der freigelegten Substratstellen**



Im Rahmen der Erfindung wird unter der Funktionalisierung der Substratoberfläche das Aufbringen von Molekülen auf die Benetzungsstellen des Substrats verstanden, die spezifisch andere Moleküle aus einer Probensubstanz binden können. Diese Moleküle werden für die Funktionalisierung in beliebigen organischen und anorganischen Lösungsmittel oder Mischungen von Flüssigkeiten gelöst mit der Hauptfläche der Trägerplatte in Kontakt gebracht. Nach einer gewissen Inkubationszeit liegen die Sondenmoleküle (Ligaten) mit dem Substrat physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ bzw. über Komplexbildung gebunden vor.

10

Auf dem Gebiet der Sensorik lassen sich mit der vorliegenden Erfindung alle Arten von Ligaten, die an den Benetzungsstellen auf die Trägerplatte aufgebracht sind, kontrolliert mit verschiedenen Analytflüssigkeiten in Kontakt bringen und diese auf das Vorhandensein ihrer spezifischen Liganden untersuchen. Als

15

Ligaten werden Moleküle bezeichnet, die spezifisch mit einem Liganden unter Ausbildung eines Komplexes wechselwirken. Beispiele von Ligaten im Sinne der vorliegenden Schrift sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme als Komplexbindungspartner eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Komplexbindungspartner eines Antigens), Antigene (als Komplexbindungspartner eines Antikörpers), Rezeptoren (als Komplexbindungspartner eines Hormons), Hormone (als Komplexbindungspartner eines Rezeptors), Nukleinsäure-Oligomere (als Komplexbindungspartner des komplementären Nukleinsäure-Oligomers) oder Metallkomplexe.

20

25

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung werden die freien Benetzungsstellen mit modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in wässriger Lösung benetzt. Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die freie Oberfläche aufgebracht werden soll, ist über einen kovalent angebondenen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen modifiziert, wobei sich diese reaktiven Gruppen bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befinden. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich bevorzugt um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche

30

reagieren können. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere der allgemeinen Formel (n x HS-Spacer)-oligo, (n x R-S-S-Spacer)-oligo oder oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo, die mit einer Goldoberfläche unter Ausbildung von Gold-Schwefelbindungen reagieren, (ii) Amine, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern und (iii) Silane, die mit oxidischen Oberflächen eine kovalente Bindung eingehen.

10 An der anderen Seite des Nukleinsäure-Oligomers ist das Molekül über einen weiteren Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge mit einem Fluorophor modifiziert, um die Funktionalisierung der freien Substratstellen zu visualisieren. Für die Funktionalisierung der freigelegten Stellen kommen sowohl Einspülen über geeignete Zuleitungskanäle als auch Spotting-Techniken in Frage.

15 **Herstellung von Substrat-Abdeckungen zur Realisierung von Flusskammern und für das Einführen von variablen Flüssigkeits-Barrieren in die Kanalstrukturen**

20 Mit Hilfe der Laser-Ablation lassen sich im Rahmen der Erfindung auch Abdeckungen für die jeweiligen Substrate mit unterschiedlichen Kanalstrukturen herstellen. Diese Abdeckungen stellen nicht nur einen Verschluss der Kanalstrukturen zur Realisierung von Flusskammern dar, sondern können auch an gewünschten Stellen Barrieren für die Analytflüssigkeiten in die Kanäle einführen. Durch diese Barrieren kann man im Falle von Kanalanordnungen mit sich kreuzenden Kanälen das Fließen der Flüssigkeiten von einem Kanal in die anliegenden Kanäle verhindern und somit Kreuzreaktionen ausschließen.

30 Zur Herstellung der oben beschriebenen Abdeckung kann eine beliebige Abdeckungsträgerplatte mit Lötstopplack beschichtet werden, dessen Dicke der Tiefe der Kanäle der zugehörigen Kanalstruktur entspricht. Anschließend wird der Lack durch Laser-Ablation so entfernt, dass nur noch die gewünschten

- 24 -

Barrieren stehen bleiben. Die Länge dieser Barrieren ist zweckmäßig durch die Breite der Zuführungskanäle und die Breite der Barrieren durch den lateralen Abstand der Kanäle gegeben. Dadurch wird eine besonders gute Abschirmung benachbarter Zuführungskanäle erreicht.

5

Realisiert man beim Design der Kanalstrukturen der Substrate eine mehrzählige Symmetrie, so kann eine einzelne Abdeckung durch Drehen um den Symmetriewinkel sukzessive als Barriere für verschiedene Teilgruppen der Zuführungskanäle fungieren. Dabei sind Substratabdeckungen möglich, die entweder nur eine oder aber mehrere der verschiedenen Kanalrichtungen offen lassen.

10

Durch die Verwendung eines Substrates mit freigelegten, funktionalisierten Benetzungsstellen in den Schnittpunkten von Kanalstrukturen mit k-zähliger Symmetrie und einer geeigneten, beweglichen Abdeckung, lassen sich alle Benetzungsstellen der Matrix sukzessive und kontrolliert mit bis zu  $k/2$  verschiedenen Analytflüssigkeiten benetzen, ohne dass Kreuzreaktionen erfolgen. Im Falle einer Anordnung von zueinander senkrechten Gruppen von Kanälen mit Reaktionsgefäßen im Kreuzungspunkt je zweier Kanäle (4-zählige Symmetrie), lassen sich im Falle einer  $n \times n$ -Matrix von Benetzungsstellen  $n^2$  Kombinationen potentieller Bindungspartner analysieren.

15

20

25

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung werden die oben beschriebenen Abdeckungen aus mit Lötstopplack beschichteten Glassubstraten hergestellt.

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

30

Nachfolgend soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Dabei sind nur die für das Verständnis der Erfindung wesentlichen Elemente dargestellt. Es zeigt

- Fig. 1 eine schematische Darstellung der Anordnung von Zuführungskanälen und Benetzungsstellen in einem Substrat nach einem Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- Fig. 2 einen Querschnitt durch das Substrat von Fig. 1 entlang der Linie II-II, teilweise mit funktionalisierten Benetzungsstellen;
- Fig. 3 in (a) und (b) SEM-Aufnahmen von durch Laser-Ablation freigelegten Benetzungsstellen in einer Stopplack-Schutzschicht;
- Fig. 4 in (a) ein AFM-Bild einer gelaserten und aufgeschmolzenen Gold-Oberfläche und in (b) ein Querschnitts-Höhenprofil entlang der Linie B-B aus Fig. 4(a);
- Fig. 5 eine Fluoreszenzaufnahme von mit Fluorophor modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren, die an freigelegten Benetzungsstellen eines Substrates immobilisiert sind;
- Fig. 6 eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen bei hohem Salzgehalt durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen.
- Fig. 7 in (a) bis (d) schematische Darstellungen der Anordnung von Zuführungskanälen nach weiteren Ausführungsbeispielen der Erfindung;

- Fig. 8 in (a) einen Ausschnitt einer möglichen Kanalstruktur und in (b) den Ausschnitt einer zugehöriger Substratabdeckung, am Beispiel einer freigelegten, quadratischen Stelle im Kreuzungspunkt zweier Kanäle mit einer Abdeckung, die je nach Stellung einen der Kanäle blockieren kann. In Fig. 8(a) ist ein Teil der Lackschicht transparent dargestellt, um das Innere der Struktur zu zeigen.
- Fig. 9 in (a) das Substrat von Fig. 7(c), bei dem jede Benetzungsstelle im Schnittpunkt zweier zueinander senkrechter Zuleitungskanäle liegt, in (b) eine zugehörige in mehreren Orientierungen auf dem Substrat platzierbare Substratabdeckung, in (c) das Substrat mit verschlossenen Spalten-Zuleitungskanälen und in (d) das Substrat mit verschlossenen Zeilen-Zuleitungskanälen;
- Fig. 10 eine schematische Darstellung eines Substrats mit einer Einsenkung nach einem anderen Ausführungsbeispiel der Erfindung; und
- Fig. 11 einen Querschnitt durch das Substrat von Fig. 10 entlang der Linie XI-XI, teilweise mit funktionalisierten Benetzungsstellen.

### **Wege zur Ausführung der Erfindung**

- 5 Ein Substrat 10 zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen nach einem ersten Ausführungsbeispiel der Erfindung und ein Verfahren zu seiner Herstellung wird nunmehr mit Bezug auf die Figuren 1 und 2 näher erläutert. Dabei zeigt Fig. 1 das Substrat 10 in Aufsicht und Fig. 2 stellt einen Querschnitt durch das Substrat 10 entlang der Linie II-II von Fig. 1 dar. Der
- 10 Übersichtlichkeit halber ist in Fig. 1 und 2 und in einigen der nachfolgenden Figuren ein Substrat mit einer lediglich 4 x 4 großen Matrix an Benetzungsstellen dargestellt. Es versteht sich, dass größere Matrizen im Rahmen der Erfindung liegen und für die parallele Analyse einer Vielzahl möglicher Reaktionen



bevorzugt sind.

Das Substrat 10 umfasst eine Trägerplatte 12, die im Ausführungsbeispiel durch ein Glas-Slide 14 mit einer aufgedampften Goldschicht 16 gebildet ist.

- 5 Dazu wird auf das Glas-Slide 14 zunächst eine in den Figuren nicht dargestellte, 5 nm dicke CrNi-Kontaktschicht und auf diese dann eine 200 nm dicke Goldschicht 16 aufgedampft.

- 10 Auf das Substrat wird ein 2-Komponenten Lötstopplack (Elpemer GL 2467 SM-DG, Fa. Peters) in einem aus der Leiterplatten-Technologie bekannten Vorhanggieß-Verfahren auf die Trägerplatte 12 aufgebracht, um eine Schutzschicht 20 für die Oberfläche 18 der Trägerplatte 12 zu bilden. Durch die Variation der Transportgeschwindigkeit der Trägerplatte 12 unter dem Lack-Vorhang lassen sich die bevorzugten Dicken der Schutzschicht 20 im Bereich  
15 von etwa 10 – 150  $\mu\text{m}$  erreichen. Im Ausführungsbeispiel der Figuren 1 und 2 weist die Schutzschicht 20 eine Dicke  $d_s$  von etwa 150  $\mu\text{m}$  auf.

- 20 Nach dem Trocknen des Lacks wird die Schutzschicht 20 mit einem Excimer-Laser der Firma Lambda-Physics durch Laserablation strukturiert. Der Laser kann über verschiedene Masken verkleinert auf das Substrat 10 abgebildet werden, wobei die Flächenintensität der Bestrahlung über die Abbildungsvorrichtung eingestellt wird. Je nach Maske lassen sich so verschiedene Geometrien der ablatierten Regionen realisieren.

- 25 Mit Hilfe der Laser-Ablation werden zwei Strukturen in die Lötstopplack-Schutzschicht 20 geschrieben. In einem ersten Strukturierungsschritt werden über eine erste Maske Zuführungskanäle 22 in den Lack geschnitten, wobei sich die Tiefe dieser Kanäle 22 durch die Anzahl der Laserpulse einstellen lässt. Eine Kanaltiefe von etwa 80 – 120  $\mu\text{m}$  wird beispielsweise mit etwa 540  
30 – 900 Pulsen ( $\lambda$  20 ns) des Lasers mit einer Flächenleistung von 600 – 1200  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  erreicht. Die Breite der Kanäle ist je nach Anwendung und gewünschtem lateralen Abstand (typisch im Bereich von 50 – 200  $\mu\text{m}$ ) beliebig einstell-

- 28 -

bar und bewegt sich typischerweise im Bereich von 10 – 150  $\mu\text{m}$ . Im Ausführungsbeispiel enthält das Substrat 10 vier parallele Zeilen-Zuführungskanäle 22 mit rechteckigem Querschnitt, die eine Tiefe von etwa 100  $\mu\text{m}$  und eine Breite von etwa 70  $\mu\text{m}$  aufweisen. Innerhalb der Kanäle ist die Dicke der Schutzschicht 20 somit von ihrem Ausgangswert  $d_s$  auf einen Wert  $d_k$  von etwa 50  $\mu\text{m}$  reduziert.

Anschließend werden in einem zweiten Strukturierungsschritt über eine zweite Maske in den Zeilenkanälen 22 vertikale Aussparungen 24 (Fig. 2) erzeugt, die sich bis zur Gold-Oberfläche 18 der Trägerplatte 12 erstrecken. Die vertikalen Aussparungen 24 definieren damit die Benetzungsstellen 26 auf der Trägerplatte 12. Dies ist in der linken Bildhälfte der Fig. 2 dargestellt.

Anzahl und Intensität der Laserpulse wird bei der Strukturierung so eingestellt, dass die Oberfläche 18 der Trägerplatte 12 in einer Oberflächenregion 28 aufgeschmolzen wird. Dadurch wird eine reduzierte Oberflächenrauigkeit und eine verbesserte Homogenität der Oberfläche erreicht. Außerdem werden durch die Ablation weniger Goldlagen von der Oberfläche Verunreinigungen entfernt. Die freigelegten Benetzungsgebiete haben typischerweise eine charakteristische Abmessung von etwa 10 bis 100  $\mu\text{m}$ . Im Ausführungsbeispiel sind die Aussparungen 24 und die Benetzungsstellen 26 kreisförmig und haben einen Durchmesser von etwa 40  $\mu\text{m}$ .

Wie weiter unten im Detail beschrieben, können die Benetzungsstellen 26 über die Zuführungskanäle 22 mit einer Flüssigkeit benetzt, und dadurch beispielsweise mit spezifischen Sondenmolekülen 30 funktionalisiert werden. Ein Substrat mit funktionalisierten Benetzungsstellen 26 ist in der rechten Bildhälfte der Fig. 2 dargestellt.

Figur 3 zeigt SEM-Aufnahmen von durch Laser-Ablation freigelegten Benetzungsstellen 26 in einer Stopplack-Schutzschicht 20. Dabei sind sowohl rechteckige bzw. quadratische Querschnitte wie in Fig. 3(a) gezeigt, als auch runde

Querschnitte, wie in Fig. 3(b) dargestellt, möglich.

Die mit dem Aufschmelzen der Gold-Oberfläche der Trägerplatte 12 verbundene Verbesserung der Oberflächenstruktur ist in Fig. 4 illustriert. Figur 4 zeigt in  
5 (a) eine AFM-Aufnahme einer Gold-Oberfläche, die in einem kreisförmigen Teilbereich durch Laserbeschuss aufgeschmolzen wurde, und in Fig. 4(b) ein Höhenprofil 40 entlang der Linie B-B von Fig. 4(a). Es ist deutlich zu erkennen, dass durch das Aufschmelzen die Rauigkeit der Oberfläche verringert und die Homogenität der bestrahlten Fläche erhöht wird. Dies erleichtert die spätere  
10 Anbindung spezifischer Sondenmoleküle an die Benetzungsstellen 26.

#### **Funktionalisierung der Benetzungsstellen des Substrats mit Nukleinsäure-Oligomeren**

15 Die Benetzungsstellen 26 des Substrats 10 können beispielsweise über ein Spotting-Verfahren mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert werden. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt dabei in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß  
20 der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 molaren Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Der Amino-Modifizierer  
25 C2 dT (Glen Research 10-1037) wird in die Sequenzen mit dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

30

Die Oligonukleotide werden mit konzentriertem Ammoniak (30%) bei 37 °C 16 h entschützt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels RP-HPL

Chromatographie nach Standardprotokollen (Laufmittel: 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer, Acetonitril), die Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS. Die aminmodifizierten Oligonukleotide werden an die entsprechenden aktivierten Fluorophore (z. B. Fluoresceinisothiocyanat) entsprechend der dem Fachmann bekannten Bedingungen gekoppelt. Die Kopplung kann sowohl vor als auch nach der Anbindung der Oligonukleotide an die Oberfläche erfolgen.

Auf ein Substrat 10 nach Fig. 1 wird doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation eins: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit  $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2\text{S})_2$  zum  $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$  verestert ist, Modifikation zwei: an das 5' Ende ist der Fluorescein-Modifizier Fluorescein-Phosphoramidite (Proglia Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) als  $5 \times 10^{-5}$  molare Lösung in Puffer (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7 mit 0.05 vol% SDS) mit Zusatz von ca.  $10^{-5}$  bis  $10^{-1}$  molarem Propanthiol (oder anderen Thiolen oder Disulfiden geeigneter Kettenlänge) mit Hilfe eines Spotters (Cartesian) aufgebracht und für 2 min – 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer  $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$  des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie Propanthiol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt). Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Für die Belegung mit dem Spotter der Firma Cartesian Technologies (Micro-Sys PA) werden Split-Pin Nadeln (ArrayIt Chipmarker Pins der Firma TeleChem) verwendet, die ein Ladevolumen von 0.2 bis 0.6  $\mu\text{L}$  haben und Volumina von etwa 1 nL pro Benetzungsvorgang abgeben. Die Kontaktfläche dieser Nadeln hat einen Durchmesser von etwa 130  $\mu\text{m}$  und ist damit deutlich größer

als die bei der Laser-Ablation freigelegten Bereiche des Substrates. Die Positionierung der Nadel über dem Substrat erfolgt mit einer Genauigkeit von 10 µm bei einer Luftfeuchtigkeit von etwa 70-80 %. Der Tropfen wird beim Kontakt der Spitze mit der Schutzschicht abgegeben und es kommt zu keiner direkten Berührung mit dem Substrat („Pseudo-Kontakt-Drucken“).

Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners der Firma Lavision Biotech kann die Belegung der freien Substratstellen mit fluoreszenz-modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren visualisiert werden. Figur 5 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von vier Benetzungsstellen, die mit derart modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert sind.

Das Nachweisprinzip ist mit Bezug auf Fig. 6 kurz dargestellt. Die Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen erfolgt bei hohem Salzgehalt durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quenchoberflächen. Vor der Hybridisierung in Teilbild i) liegt das einzelsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen geringen Abstand 205 von Fluorophor 203 und quencher Metalloberfläche 204, beispielsweise Gold, charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung (Bezugszeichen 202) mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang, dem Target, vergrößert sich der Abstand 206 des Fluorophors 203 von der quencher Metalloberfläche 204, wie in Teilbild ii) dargestellt und die Fluoreszenzintensität steigt signifikant.

25

#### **Funktionalisierung der freien Benetzungsstellen des Substrates durch Einspülen von Nukleinsäure-Oligomeren in die Zuführungskanäle**

Nach der Erfindung werden die Benetzungsstellen des Substrats 10 bevorzugt durch Einspülen von Nukleinsäure-Oligomeren in die Zuführungskanäle 22 funktionalisiert.



- 32 -

Dazu wird beispielsweise ein Substrat 10 wie in Fig. 1 und 2 gezeigt mit einer 4 x 4 Matrix freigelegter Benetzungsstellen 26 verwendet. Das Substrat wird mit einem Glassubstrat, das mit einer homogene 50 µm dicken Lötstopplackschicht beschichtet ist bedeckt und anschließend eine Lösung mit den oben  
5 beschriebenen Nukleinsäure-Oligomeren in die Kanalstruktur eingespült. Nach einer Inkubationszeit von 2 min – 24 h wird der Glasdeckel entfernt, das Substrat gespült und die Funktionalisierung der freien Stellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners visualisiert. Man erhält ein Substrat mit funktionalisierten Benetzungsstellen 26, wie im rechten Teilbild der Fig. 2 illustriert. Da vier un-  
10 abhängige Zeilenkanäle vorgesehen sind, können die Benetzungsstellen in einfacher Weise mit vier verschiedenen Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert werden.

#### 15 **Alternative Gestaltungen der Zuführungskanäle**

Figur 7 zeigt in (a) bis (d) schematische Darstellungen der Anordnung von Zuführungskanälen nach weiteren Ausführungsbeispielen der Erfindung.

20 Bei dem Ausführungsbeispiel der Fig. 7(a) sind jeweils zwei Zeilenkanäle 50 und 52 auf einer Substratseite verbunden, so dass U-förmige Kanäle 54 entstehen, deren Einlass und Auslass sich auf derselben Seite des Substrats 10 befinden.

25 In Fig. 7(b) ist ein Ausführungsbeispiel dargestellt, bei dem nur ein einziger Zuführungskanal 60 vorgesehen ist, der sich mäanderartig über das gesamte Substrat erstreckt und dabei alle Benetzungsstellen 26 erfasst.

30 Zur Funktionalisierung der Substrate nach Fig. 7(a) und 7(b) werden diese jeweils mit einem beschichteten Glassubstrat bedeckt, und eine oben beschriebene Nukleinsäure-Oligomer-Lösung in die Kanalstruktur eingespült. Nach einer Inkubationszeit von 2 min – 24 h wird der Glasdeckel entfernt, die

Substrate gespült und die Funktionalisierung der freien Stellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners visualisiert.

Kanalstrukturen, bei denen die Benetzungsstellen im Schnittpunkt von zwei  
5 oder mehr Zuführungskanälen liegen, sind in den Fig. 7(c) und 7(d) dargestellt.  
Figur 7(c) zeigt eine quadratische Matrix aus Zeilen-Zuführungskanälen 70  
und Spalten-Zuführungskanälen 72, in deren Schnittpunkte jeweils eine Be-  
netzungsstelle 26 angeordnet ist. Jede Benetzungsstelle 26 kann somit so-  
wohl über einen Zeilen-Zuführungskanal 70 als auch über einen Spalten-  
10 Zuführungskanal 72 mit einer Flüssigkeit benetzt werden. Eine bevorzugte  
Anwendung eines solchen Substrats ist weiter unten ausführlich beschrieben.

In Erweiterung dieses Konzepts können die Benetzungsstellen 26 auch im  
Schnittpunkt von mehr als zwei Kanälen liegen. Einen Ausschnitt aus einer  
15 solchen Kanalstruktur zeigt Fig. 7(d), wo jede Benetzungsstelle 26 im Schnitt-  
punkt von vier Zuführungskanälen 74 liegt.

### **Substratabdeckungen**

20

Substrate, bei denen die Benetzungsstellen im Schnittpunkt mehrerer Zufüh-  
rungskanäle 22 liegen, werden bevorzugt zusammen mit Substratabdeckun-  
gen eingesetzt, die zum einen die Zuführungskanäle 22 zur Ausbildung von  
Flusskammern nach oben verschließen und die zum anderen geeignet ange-  
25 ordnete Barriereelemente für die Analytflüssigkeiten aufweisen, die einen Teil  
der Zuführungskanäle blockieren. Durch diese Barriereelemente kann man bei  
sich kreuzenden Kanälen das Fließen der Flüssigkeiten von einem Kanal in  
die benachbarten Kanäle verhindern und somit Kreuzreaktionen vermeiden.

30 Beispielsweise kann eine erste Substratabdeckung für das Versperren der  
Spalten-Zuführungskanäle und eine zweite Substratabdeckung für das Ver-  
sperren der Zeilen-Zuführungskanäle vorgesehen sein. Bevorzugt ist aller-

dings im Rahmen der Erfindung, dass eine einzige Substratabdeckung sowohl für das Versperren der Zeilen-Zuführungs Kanäle, als auch nach entsprechender Neuorientierung der Abdeckung, für das Versperren der Spalten-Zuführungs Kanäle eingesetzt wird.

5

Solche Substratabdeckungen lassen sich mit Hilfe der Laser-Ablation für Substrate mit unterschiedlichen Kanalstrukturen herstellen. Das Prinzip ist mit Bezug auf Fig. 8 illustriert. Figur 8(a) zeigt einen Ausschnitt einer Kanalstruktur, bei der eine quadratische vertikale Aussparung 26 im Schnittpunkt eines Zeilen-Zuführungs Kanals 70 und eines Spalten-Zuführungs Kanals 72 angeordnet ist. Der Zeilen-Zuführungs Kanal 70 und der Spalten-Zuführungs Kanal 72 haben beide denselben rechteckigen Querschnitt. Ein Teil der Lackschicht ist in der Figur transparent dargestellt, um das Innere der Struktur zu zeigen.

10

Figur 8(b) stellt den entsprechenden Ausschnitt einer Substratabdeckung 80 dar, die je nach Orientierung den Zeilen-Zuführungs Kanal 70 oder den Spalten-Zuführungs Kanals 72 blockieren kann. Die beiden, auf einer Abdeckungsträgerplatte 82 angeordneten Barriereelemente 84 sind in Form und Größe auf die Form und Größe der Zuführungs Kanäle 70 und 72 des Substrats abgestimmt und verschließen aufgrund der Symmetrie der Anordnung in einer ersten Orientierung den Zeilen-Zuführungs Kanal 70 und in einer dazu um 90° gedrehten zweiten Orientierung den Spalten-Zuführungs Kanal 72.

20

Zur Herstellung einer solchen Substratabdeckung 80 wird eine beliebige Abdeckungsträgerplatte 82, beispielsweise ein Glas-Slide, mit Lötstopplack beschichtet, dessen Dicke mindestens der Tiefe der Kanäle des Substrats 10 entspricht und beispielsweise 80 bis 120 µm beträgt. Anschließend wird der Lack durch Laser-Ablation soweit entfernt, dass nur noch die gewünschten Barriereelemente 84 stehen bleiben. Die Substratabdeckung kann beispielsweise durch Bestrahlen des Gebiets außerhalb der Barrieren mit etwa 540 – 900 Pulsen (à 20 ns) des obengenannten Excimer-Lasers mit einer Flächenleistung von 600 – 1200 mJ/cm<sup>2</sup> erreicht werden.

30

### **Sukzessives Einspülen von Nukleinsäure-Oligomeren in die Zuführungskanäle eines Substrates unter Verwendung einer Substratabdeckung**

5

Der Einsatz eines Substrats mit einer beschriebenen Substratabdeckung wird nunmehr im Zusammenhang mit Fig. 9 erläutert. Figur 9 zeigt in (a) ein Substrat mit 4 x 4 Benetzungsstellen 26 und einer Anordnung von parallelen Zeilen-Zuführungskanälen 70 und Spalten-Zuführungskanälen 72, wie bei Fig.

10 7(c) beschrieben.

Fig. 9(b) zeigt die zugehörige Substratabdeckung 80 mit den auf die Kanalanordnung abgestimmten Barriereelementen 84. Die Abmessungen der Barriereelemente 84 sind zweckmäßig durch die Breite  $b_K$  der Zuführungskanäle 70, 72 und den lateralen Abstand  $\Delta_K$  der Kanäle gegeben. Dadurch wird eine besonders gute Abschirmung benachbarter Zuführungskanäle erreicht, da der Zwischenraum zwischen den benachbarter Zuführungskanälen durch die Barriereelemente 84 vollständig ausgefüllt wird. Die Höhe der Barriereelemente 84 entspricht der Kanaltiefe im Substrat 10.

20

Platziert man die Substratabdeckung 80 in einer ersten Orientierung auf dem Substrat 10, so blockieren die Barriereelemente 84 gerade die Spalten-Zuführungskanäle 72 und lassen die Zeilen-Zuführungskanäle 70 offen (Fig. 9(c)). In dieser Stellung wird in die vier offenen Zeilen-Zuführungskanäle 70 des Substrates je eine Lösung mit doppelt modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren nach dem oben beschriebenen Beispiel mit unterschiedlichen Sequenzen eingespült, die dann die entsprechenden Benetzungsstellen 26 des Kanals 70 funktionalisieren. Nach einer Inkubationszeit von 2 – 24 h werden die Zeilen-Zuführungskanäle 70 gespült, die Abdeckung 80 angehoben und die Fluoreszenz der Spots mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners der Firma Lavision Biotech als Referenz-Signal der Funktionalisierung bestimmt.

30

- 36 -

Nun wird die Substratabdeckung 80 um 90° gedreht und erneut auf das Substrat 10 aufgebracht (Fig. 9(d)). Dann werden die Spalten-Zuführungskanäle 72 mit je einer unmodifizierte Nukleinsäure-Oligomere verschiedener Sequenzen enthaltenden Analytflüssigkeit (0,500 molar Phosphat-Puffer, pH 7, mit 1 molarer NaCl und 0.05 vol% SDS) gefüllt. Die Synthese dieser Oligonukleotide erfolgt ebenfalls in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese.

- 10 Nach einer geeigneten Inkubationszeit unter hybridisierenden Bedingungen werden die offenen Kanäle gespült, die Substratabdeckung 80 abgenommen und eine zweite Fluoreszenzmessung der funktionalisierten Benetzungsstellen 26 des Substrates mit dem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Enthält eine bestimmte Analytflüssigkeit keine zu den Nukleinsäure-Oligomeren einer bestimmten Benetzungsstelle 26 komplementäre Oligonukleotide, so entspricht die Fluoreszenzintensität der zweiten Messung im Wesentlichen der Referenzmessung. Im Falle der Hybridisierung von immobilisierter Oligonukleotide einer Benetzungsstelle mit Molekülen der jeweiligen Analytflüssigkeit, so ergibt sich eine im Vergleich zur Referenzmessung deutlich höhere Fluoreszenzintensität, wie oben in Zusammenhang mit Fig. 6 erläutert.

Für die 4 x 4 Matrix an Benetzungsstellen 26 lassen sich so  $4^2 = 16$  Kombinationen potentieller Bindungspartner analysieren. Bei Verwendung größerer Matrizen lassen sich so rasch eine Vielzahl möglicher Reaktionen in kurzer Zeit automatisiert und parallel untersuchen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für ein beschriebenes Substrat mit einer n x n-Matrix an Benetzungsstellen in den Schnittpunkten von je einem Zeilen-Zuführungskanal und einem Spalten-Zuführungskanal mit zugehöriger Substratabdeckung ist die "on-chip" Synthese von Nukleinsäure-Oligomeren.

Hierbei werden zu Beginn an Stelle der Nukleinsäure-Oligomere Nukleinsäure-



Monomere für die Funktionalisierung der Benetzungsstellen eingespült. Anschließend werden sukzessive weitere Nukleinsäure-Monomere über die Kanalstrukturen mit Hilfe von Substratabdeckungen an die gewünschten Benetzungsstellen transportiert, wo sie mit aus dem Stand der Technik bekannter  
5 Phosphoramidit-Chemie an die dort vorhandenen Nukleinsäure-Oligomere koppeln. Somit lassen sich an allen Benetzungsstellen des Substrats Nukleinsäure-Oligomere mit verschiedenen Sequenzen synthetisieren, also z.B. alle 65536 Nukleinsäure-Oktamere auf einer 256 x 256-Matrix von Benetzungsstellen.

10

### Antikörper-Assay

In einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung wird ein Substrat mit einer  
15 gleichmäßigen Matrix von 3 x 3 freigelegten Benetzungsstellen in den Kreuzungspunkten von je zwei Zuführungskanälen analog zu Figur 7(c) nebst einer zugehöriger Abdeckung hergestellt.

Nach Anbringen der Abdeckung in der ersten Orientierung werden in die 3  
20 offenen Zeilen-Zuführungskanäle des Substrates 3 verschiedene Antikörper eingespült ( $Ak_1$ ,  $Ak_2$ ,  $Ak_3$ ), die jeweils nach Standardverfahren mit Thiol-Ankern für die Anbindung an die Goldoberfläche versehen werden. Nachdem die Zeilen-Zuführungskanäle gespült wurden, wird die um 90° gedrehte Abdeckung erneut aufgebracht und die nun offenen Spalten-Zuführungskanäle mit 3  
25 verschiedenen flüssigen Proben gefüllt, die unterschiedliche Zusammensetzungen an Proteinen bzw. Antigenen beinhalten. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird das Substrat erneut gespült. Spezifische Antikörper-Protein Komplexe haben sich nur an jenen Benetzungsstellen ausgebildet, die mit Proben in Kontakt waren, in denen die jeweils passenden Proteine bzw. Antigene ent-  
30 halten waren.

Zur Visualisierung der Komplexe auf den Benetzungsstellen werden in einem

weiteren Schritt 3 Mischungen von Antikörpern verwendet, wobei die Antikörper nach Standardverfahren mit einem Fluoreszenz-Label (z.B. Fluorescein) modifiziert wurden. Diese Antikörper-Mischungen werden mit der erneut um 90° gedrehten Abdeckung in die Zeilen-Zuführungskanäle der mit gleichen Antikörpern  $Ak_i$  funktionalisierten Spots eingespült. Die Antikörper einer Mischung sind hierbei jeweils auf die möglichen Antikörper-Protein Komplexe der Spot-Reihe abgestimmt, so dass an jedem vorhandenen Komplex ein Antikörper binden kann. Nach einer gewissen Inkubationszeit werden die Kanäle gespült und der Chip mit Hilfe eines Fluoreszenz-Readers (Lavision Biotech) ausgelesen.

#### **Funktionalisierung der freien Benetzungsstellen eines Substrates durch Einspülen von Nukleinsäure-Oligomeren in eine Substrateinsenkung**

Ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in den Figuren 10 und 11 dargestellt. Figur 10 zeigt ein Substrat 100 zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen in Aufsicht, Fig. 11 stellt einen Querschnitt durch das Substrat 100 entlang der Linie XI-XI von Fig. 10 dar.

Das Substrat 100 umfasst wie das Substrat 10 des ersten Ausführungsbeispiels eine Trägerplatte 102 aus einem Glas-Slide 104 mit einer aufgedampften CrNi-Kontaktschicht und einer darauf aufgedampften Goldschicht 106.

Auf die Trägerplatte 102 wird ein 2-Komponenten Lötstopplack aufgebracht, um eine Schutzschicht 120 einer Dicke von etwa 10 bis etwa 150  $\mu\text{m}$ , im Ausführungsbeispiel von etwa 120  $\mu\text{m}$ , zu erzeugen. Nach dem Trocknen wird die Schutzschicht 120 mit einem Excimer-Lasers durch Laserablation strukturiert.

Dabei wird in einem ersten Strukturierungsschritt eine Einsenkung 122 in den Lack geschnitten, die eine laterale Abmessung von 600  $\mu\text{m}$  x 600  $\mu\text{m}$  und eine Tiefe von etwa 100  $\mu\text{m}$  aufweist. Die Einsenkung 122 ist von einem umlaufenden Rand 110 umgeben, so dass ein Vorratsvolumen zur Aufnahme der Be-

netzungsflüssigkeit entsteht.

Am Boden der Einsenkung 122 werden in einem zweiten Strukturierungsschritt vertikale Aussparungen 124 mit einem Durchmesser von etwa 30 µm erzeugt,  
5 die sich bis zur Gold-Oberfläche der Trägerplatte 102 erstrecken und die vorbestimmten Benetzungsstellen 126 auf der Trägerplatte definieren (linke Bildhälfte der Fig. 11).

Zur Funktionalisierung der Besetzungsstellen 126 wird die Einsenkung mit den  
10 Nukleinsäure-Oligomeren 130 des oben beschriebenen Beispiels befüllt, nach einer Inkubationszeit von 2 - 24 h gespült und die in der rechten Bildhälfte der Fig. 11 dargestellte Funktionalisierung der freien Stellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners der Firma Lavision Biotech visualisiert.

### Patentansprüche

- 5     1. Substrat zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit  
kleinen Flüssigkeitsvolumina, mit
- 10     – einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche zur Benetzung  
mit einer Flüssigkeit an vorbestimmten Benetzungsstellen, und
- einer auf die Trägerplatte aufgebrachten flächigen Schutzschicht, die  
die Hauptfläche von der Umgebung trennt,
- wobei die Schutzschicht
- 15     – sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstreckende vertikale Ausspa-  
rungen aufweist, die die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der  
Trägerplatte definieren, und
- 20     – einen oder mehrere zu den vertikalen Aussparungen führende Zufüh-  
rungskanäle mit reduzierter Dicke der flächigen Schutzschicht enthält,  
zum Zuführen der Benetzungsflüssigkeit zu den vorbestimmten Benet-  
zungsstellen.
- 25     2. Substrat nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
die vertikalen Aussparungen in dem Zuführungskanal oder den Zufüh-  
rungskanälen angeordnet sind.
- 30     3. Substrat nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
jede vertikale Aussparung in genau einem Zuführungskanal liegt,
4. Substrat nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass**

- 41 -

jede vertikale Aussparung im Schnittpunkt von mehreren, bevorzugt von genau zwei Zuführungskanälen liegt.

5. Substrat nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
5 in einem Schnittpunkt von zwei oder mehreren Zuführungskanälen jeweils eine Gruppe von mehreren vertikalen Aussparungen liegt.
6. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
10 die vertikalen Aussparungen oder Aussparungsgruppen in Form einer  $n \times m$  Matrix mit  $n$  Zeilen und  $m$  Spalten angeordnet sind, wobei  $n$  und  $m$  größer oder gleich 2 sind, und wobei bevorzugt  $n$  und  $m$  jeweils zwischen 10 und 1000 liegen.
- 15 7. Substrat nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Anzahl  $n$  der Zeilen und die Anzahl  $m$  der Spalten gleich ist, und/oder dass die lateralen Abstände benachbarter Aussparungen oder Aussparungsgruppen in den Zeilen und Spalten gleich sind.
- 20 8. Substrat nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die  $m$  Aussparungen oder Aussparungsgruppen einer Zeile jeweils in einem von  $n$  parallelen Zeilen-Zuführungskanälen angeordnet sind.
9. Substrat nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
25 die  $n$  Aussparungen oder Aussparungsgruppen einer Spalte jeweils in einem von  $m$  parallelen Spalten-Zuführungskanälen angeordnet sind, so dass jede Aussparung im Schnittpunkt zweier Zuführungskanäle liegt.
10. Substrat nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
30 die Zeilen-Zuführungskanäle und die Spalten-Zuführungskanäle gleiche Querschnittsform aufweisen.



11. Substrat nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
jeweils eine  $n' \times m'$  Teilmatrix von Aussparungen oder Aussparungsgruppen in einem mäanderförmigen Zuleitungskanal angeordnet ist, wobei  $n = k_n \cdot n'$  und  $m = k_m \cdot m'$  ist, mit ganzen Zahlen  $k_n$  und  $k_m$  größer oder gleich 1.  
5
12. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Dicke der Schutzschicht in den Zuführungskanälen gegenüber der Dicke der Schutzschicht außerhalb der Aussparungen und Zuführungskanäle um 10% bis 99%, bevorzugt um 20% bis 95%, besonders bevorzugt um 50% bis 95% reduziert ist.  
10
13. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Schutzschicht außerhalb der Aussparungen und Zuführungskanäle eine Dicke  $d_s$  zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$  aufweist.  
15
14. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Schutzschicht in den Zuführungskanälen eine reduzierte Dicke  $d_k$  zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen etwa 10  $\mu\text{m}$  und etwa 50  $\mu\text{m}$  aufweist.  
20
15. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Zuführungskanäle im Wesentlichen parallel zur Hauptfläche der Trägerplatte verlaufen.  
25
16. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
30

die Zuführungskanäle rechteckigen oder trapezförmigen Querschnitt aufweisen.

17. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

5 **dadurch gekennzeichnet, dass**

die Zuführungskanäle eine charakteristische Breite  $b_K$  zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 250  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von etwa 10  $\mu\text{m}$  bis etwa 150  $\mu\text{m}$  aufweisen.

18. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

10 **dadurch gekennzeichnet, dass**

die Benetzungsstellen eine charakteristische Ausdehnung von etwa 5  $\mu\text{m}$  bis etwa 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von etwa 10  $\mu\text{m}$  bis etwa 100  $\mu\text{m}$  aufweisen.

19. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

15 **dadurch gekennzeichnet, dass**

die vertikalen Aussparungen einen im Wesentlichen rechteckigen, elliptischen oder kreisförmigen Querschnitt aufweisen.

20. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

20 **dadurch gekennzeichnet, dass**

die Schutzschicht aus einem Material besteht, das an die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ bzw. über Komplexbildung bindet.

25 21. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Schutzschicht durch einen positiven oder negativen Photolack, einen Lötstopplack, ein organisches Polymer, insbesondere Cellulose, Dextran oder Collagen gebildet ist.

30

22. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Trägerplatte einen Grundkörper aus Kunststoff, Metall, Halbleiter, Glas, Verbundstoff, einem porösem Material oder einer Kombination dieser Materialien aufweist, wobei die Trägerplatte bei einem nicht-leitfähigen Grundkörper bevorzugt mit einer leitfähigen Schicht, insbesondere aus Silizium, Platin oder Gold versehen ist, welche dann die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte bildet.

23. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**

10 die vorbestimmten Benetzungsstellen mit spezifischen Sondenmolekülen funktionalisiert sind, insbesondere, dass Sondenmoleküle an den vorbestimmten Benetzungsstellen an die Hauptfläche der Trägerplatte physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ oder über Komplexbildung gebunden sind.

15

24. Substrat nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
die vorbestimmten Benetzungsstellen mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert sind, die mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen modifiziert sind.

20

25. Substrat nach Anspruch 22 und 24, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte durch eine Goldschicht gebildet ist und die vorbestimmten Benetzungsstellen mit Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierten Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert sind.

25

26. Substrat nach Anspruch 24 oder 25, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Nukleinsäure-Oligomere mit einem Fluorophor modifiziert sind.

30 27. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**

das Substrat mit einer Deckplatte bedeckt ist, die die Zuführungskanäle zur Ausbildung von Flusskammern nach oben verschließt.

28. Substrat zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit  
5 kleinen Flüssigkeitsvolumina, mit

– einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche zur Benetzung mit einer Flüssigkeit an vorbestimmten Benetzungsstellen, und

10 – einer auf die Trägerplatte aufgetragenen flächigen Schutzschicht, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt,

wobei die Schutzschicht

15 – eine oder mehrere Einsenkungen mit reduzierter Dicke der flächigen Schutzschicht zur Aufnahme eines Vorratsvolumens von Benetzungsflüssigkeiten enthält, und

20 – in den Einsenkungen angeordnete, sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstreckende vertikale Aussparungen aufweist, die die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Trägerplatte definieren, und die die Benetzungsflüssigkeiten der jeweiligen Einsenkungen aufnehmen.

29. Substrat nach Anspruch 28,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

25 die vertikalen Aussparungen in Form einer  $n \times m$  Matrix mit  $n$  Zeilen und  $m$  Spalten angeordnet sind, wobei  $n$  und  $m$  größer oder gleich 2 sind, und wobei bevorzugt  $n$  und  $m$  jeweils zwischen 4 und 20 liegen.

30. Substrat nach Anspruch 28 oder 29, **dadurch gekennzeichnet, dass die**

30 Anzahl  $n$  der Zeilen und die Anzahl  $m$  der Spalten gleich ist, und/oder dass die lateralen Abstände benachbarter Aussparungen in den Zeilen und Spalten gleich sind.

31. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 30,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

5 die Dicke der Schutzschicht in den Einsenkungen gegenüber der Dicke der Schutzschicht außerhalb der Aussparungen und der Einsenkungen um 10% bis 99%, bevorzugt um 20% bis 95%, besonders bevorzugt um 50% bis 95% reduziert ist.

32. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 31,

10 **dadurch gekennzeichnet, dass**

die Schutzschicht außerhalb der Aussparungen und der Einsenkungen eine Dicke  $d_s$  zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$  aufweist.

15 33. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 32,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Schutzschicht in den Einsenkungen eine reduzierte Dicke  $d_k$  zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen etwa 10  $\mu\text{m}$  und etwa 50  $\mu\text{m}$  aufweist.

20

34. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 33,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Einsenkungen einen rechteckigen oder trapezförmigen Querschnitt aufweisen.

25

35. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 34,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die Einsenkungen eine charakteristische Abmessung  $A_k$  zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 2000  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von etwa 300  $\mu\text{m}$  bis etwa 1000  $\mu\text{m}$  aufweisen.

30

36. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 35,

**dadurch gekennzeichnet, dass**



- 47 -

die Benetzungsstellen eine charakteristische Ausdehnung von etwa 5 µm bis etwa 200 µm, bevorzugt von etwa 10 µm bis etwa 100 µm aufweisen.

37. Substrat nach einem der Ansprüche 27 bis 36,

5     **dadurch gekennzeichnet, dass**  
die vertikalen Aussparungen einen im Wesentlichen rechteckigen, elliptischen oder kreisförmigen Querschnitt aufweisen.

38. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 37,

10     **dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Schutzschicht aus einem Material besteht, das an die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ bzw. über Komplexbildung bindet.

15     39. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 38,

**dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Schutzschicht durch einen positiven oder negativen Photolack, einen Lötstopplack, ein organisches Polymer, insbesondere Cellulose, Dextran oder Collagen gebildet ist.

20

40. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 39,

**dadurch gekennzeichnet, dass**  
die Trägerplatte einen Grundkörper aus Kunststoff, Metall, Halbleiter, Glas, Verbundstoff, einem porösem Material oder einer Kombination dieser Ma-  
25     terialien aufweist, wobei die Trägerplatte bei einem nicht-leitfähigen Grundkörper bevorzugt mit einer leitfähigen Schicht, insbesondere aus Silizium, Platin oder Gold versehen ist, welche dann die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte bildet.

30     41. Substrat nach einem der Ansprüche 28 bis 40,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die vorbestimmten Benetzungsstellen mit spezifischen Sondenmolekülen funktionalisiert sind, insbesondere, dass Sondenmoleküle an den vorbestimmten Benetzungsstellen an die Hauptfläche der Trägerplatte physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ oder über Komplexbildung gebunden sind.

5

42. Substrat nach Anspruch 41, **dadurch gekennzeichnet, dass** die vorbestimmten Benetzungsstellen mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert sind, die mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen modifiziert sind.

10

43. Substrat nach Anspruch 40 und 42, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zu benetzende Hauptfläche der Trägerplatte durch eine Goldschicht gebildet ist und die vorbestimmten Benetzungsstellen mit Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierten Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert sind.

15

44. Substrat nach Anspruch 42 oder 43, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Nukleinsäure-Oligomere mit einem Fluorophor modifiziert sind.

20

45. Substratabdeckung für ein Substrat nach einem Ansprüche 1 bis 27 mit einer Abdeckungsträgerplatte mit einer Mehrzahl vorspringender Barriereelemente, deren Form und Größe auf die Form und Größe der Zuführungskanäle des Substrats abgestimmt sind, um die Zuführungskanäle in Teilbereichen zu verschließen.

25

46. Substratabdeckung nach Anspruch 45 für ein Substrat nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Barriereelemente auf der Abdeckungsträgerplatte so angeordnet sind, dass sie nach dem Verbinden der Substratabdeckung mit dem Substrat nur die Zeilen-Zuführungskanäle oder nur die Spalten-Zuführungskanäle verschließen.

30

47. Flusskammer mit einem Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 27 und einer Substratabdeckung nach Anspruch 45 oder 46, die mit dem Substrat permanent oder lösbar verbunden ist.

5

48. Flusskammer nach Anspruch 47, **dadurch gekennzeichnet, dass**

- die Anordnung der Aussparungen und der Zuführungskanäle des Substrats eine mehrzählige Symmetrie aufweist, und

10

- die Barriereelemente der Substratabdeckung so auf der Abdeckungs-trägerplatte angeordnet sind, dass die Substratabdeckung in verschiedenen Orientierungen auf dem Substrat platzierbar ist und dabei unterschiedliche Teilebereiche der Zuführkanäle verschließt.

15

49. Flusskammer nach Anspruch 48 mit einem Substrat nach Anspruch 10, bei dem die Substratabdeckung in einer ersten Orientierung die Zeilen-Zuführungskanäle und in einer zweiten, um 90° gegen die erste Orientierung gedrehten Orientierung die Spalten-Zuführungskanäle verschließt.

20

50. Verfahren zum Herstellen eines Substrats zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit kleinen Flüssigkeitsvolumina, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 27, mit den Verfahrensschritten:

25

a) Bereitstellen einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche,

b) Aufbringen einer flächigen Schutzschicht auf die Trägerplatte, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt,

30

c) Strukturieren der Schutzschicht zur Erzeugung eines oder mehrerer Zuführungskanäle mit reduzierter Schutzschichtdicke, und

- d) Erzeugen vertikaler Aussparungen in dem Zuführungskanal oder den Zuführungskanälen, welche sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstrecken und die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Hauptfläche der Trägerplatte definieren.

5

51. Verfahren zum Herstellen eines Substrats zur kontrollierten Benetzung vorbestimmter Benetzungsstellen mit kleinen Flüssigkeitsvolumina, insbesondere nach einem der Ansprüche 28 bis 44, mit den Verfahrensschritten:

10

- a) Bereitstellen einer Trägerplatte mit einer horizontalen Hauptfläche,  
b) Aufbringen einer flächigen Schutzschicht auf die Trägerplatte, die die Hauptfläche von der Umgebung trennt,

15

- c) Strukturieren der Schutzschicht zur Erzeugung einer Einsenkung mit reduzierter Schutzschichtdicke, und

20

- d) Erzeugen vertikaler Aussparungen in der Einsenkung, welche sich zur Hauptfläche der Trägerplatte erstrecken und die vorbestimmten Benetzungsstellen auf der Hauptfläche der Trägerplatte definieren.

25

52. Verfahren nach Anspruch 50 oder 51, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Schutzschicht ein Lötstopplack mit einem Vorhanggießverfahren aufgebracht wird.

30

53. Verfahren nach einem der Ansprüche 50 bis 52, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Aussparungen und/oder die Zuführungskanäle bzw. die Einsenkung mittels Laserablation, insbesondere durch Bestrahlung von Teilbereichen der Schutzschicht mit kontinuierlicher oder gepulster Laserstrahlung einer

vorbestimmten Wellenlänge, bevorzugt im ultravioletten Spektralbereich erzeugt werden.

54. Verfahren nach Anspruch 53, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
5 eine Oberflächenregion der Trägerplatte beim Erzeugen der Aussparungen in Schritt d) im Bereich der Benetzungsstellen aufgeschmolzen wird.
55. Verfahren nach einem der Ansprüche 50 bis 54,  
**dadurch gekennzeichnet, dass**  
10 die vorbestimmten Benetzungsstellen in einem Schritt e) mit spezifischen Sondenmolekülen funktionalisiert werden.
56. Verfahren nach Anspruch 55, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
15 die vorbestimmten Benetzungsstellen in Schritt e) mit einem Spotting-Verfahren mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert werden.
57. Verfahren nach Anspruch 50 und 55, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
20 die vorbestimmten Benetzungsstellen in Schritt e) durch Einspülen einer Lösung mit Nukleinsäure-Oligomeren in die Zuführungskanäle funktionalisiert werden.
58. Verfahren nach Anspruch 51 und 55, **dadurch gekennzeichnet, dass**  
25 die vorbestimmten Benetzungsstellen in Schritt e) durch Befüllen der Einsenkung mit einer Lösung mit Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert werden.